

AF

Japanese Patent Kokai No.193,098/96

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8-193098

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 7 月 30 日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C07K 14/52		8517-4H		
C07H 21/04		B		
C12N 1/21		8828-4B		
15/09	ZNA			
C12P 21/00		C		
審査請求 未請求 請求項の数 27 F D (全 18 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平 7-262062  
(22) 出願日 平成 7 年 (1995) 9 月 18 日  
(31) 優先権主張番号 特願平 6-304203  
(32) 優先日 平 6 (1994) 11 月 15 日  
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

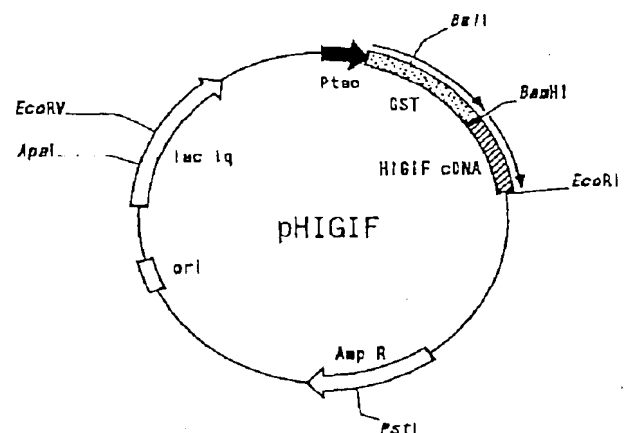
(71) 出願人 000155908  
株式会社林原生物化学研究所  
岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号  
(72) 発明者 牛尾 真平  
岡山県岡山市福成 1 丁目 166 番 6 号  
(72) 発明者 鳥越 角二  
岡山県倉敷市藤戸町藤戸 1343 番地の 5  
(72) 発明者 谷本 忠雄  
岡山県岡山市山崎 312 番地の 88  
(72) 発明者 岡村 春樹  
大阪府茨木市中穂積 2 丁目 12 番 32 号  
(72) 発明者 栗本 雅司  
岡山県岡山市学南町 2 丁目 7 番 25 号

(54) 【発明の名称】 インターフェロン- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチド

(57) 【要約】

【課題】 免疫担当細胞において IFN- $\gamma$  の産生を誘導するポリペプチド、そのポリペプチドをコードする DNA、その DNA を含む組換え DNA 及び形質転換体並びにその形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、そのポリペプチドをコードする DNA と、その DNA と自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換え DNA と、その組換え DNA を適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン $\gamma$ の産生を誘導するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項2又は3に記載のDNA。

【請求項5】 配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項2、3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 ヒトに由来する請求項2、3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 DNAがヒトに由来する請求項7、8、9又は10に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 ベクターがプラスミドベクターである請求項7、8、9、10又は11に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項13】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項14】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項13に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項13又は14に記載の形質転換体。

【請求項16】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項13、14又は15に記載の形質転換体。

【請求項17】 DNAがヒトに由来する請求項13、14、15又は16に記載の形質転換体。

【請求項18】 ベクターがプラスミドベクターである請求項13、14、15、16又は17に記載の形質転換体。

20 【請求項19】 宿主が大腸菌である請求項13、14、15、16、17又は18に記載の形質転換体。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を栄養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法。

30 【請求項21】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項20に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項22】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項20又は21に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項23】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列（ただし、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。）を有する請求項20、21又は22に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項24】 DNAがヒトに由来する請求項20、21、22又は23に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項25】 ベクターがプラスミドベクターである請求項20、21、22、23又は24に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項26】 宿主が大腸菌である請求項20、21、22、23、24又は25に記載のポリペプチドの製造方法。

50 【請求項27】 産生したポリペプチドを塩析、透析、

濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動及び又は等電点電気泳動により採取する請求項20、21、22、23、24、25又は26に記載のポリペプチドの製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、免疫担当細胞においてインターフェロン $\gamma$ （以下、「IFN $\gamma$ 」と略記する。）の産生を誘導する新規なポリペプチドに関するものである。

##### 【0002】

【従来の技術】IFN $\gamma$ は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトジェンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN $\gamma$ はその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が嚆矢され、現在では脳腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN $\gamma$ は免疫担当細胞が産生する天然型IFN $\gamma$ と、免疫担当細胞から採取したIFN $\gamma$ をコードするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN $\gamma$ に大別され、上記臨床試験においては、これらのうちのいずれかが「外来IFN $\gamma$ 」として投与されている。

【0003】このうち、天然型IFN $\gamma$ は、通常、培養株化した免疫担当細胞をIFN $\gamma$ 誘導剤を含む培養培地で培養し、その培養物を精製することにより製造される。この方法では、IFN $\gamma$ 誘導剤の種類がIFN $\gamma$ の産生量や精製のし易さ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンカナバリンA、レンズ豆レクチン、アメリカヤマゴボウレクチン、エンドトキシン、リボ多糖などのマイトジェンが頻用される。しかしながら、これら物質は、いずれも分子に多様性があり、給源や精製方法によって品質が変動し易く、誘導能の一定したIFN $\gamma$ 誘導剤を所望量入手し難いという問題がある。くわえて、上記物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質に依っては毒性を示すものすらあり、生体に直接投与してIFN $\gamma$ の産生を誘導するのが極めて困難であった。

##### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、免疫担当細胞においてIFN $\gamma$ の産生を誘導する新規なポリペプチドを提供することにある。

【0005】この発明の別の目的は、斯かるポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

【0006】この発明のさらに別の目的は、斯かるDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組

換えDNAを提供することにある。

【0007】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【0008】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を用いる上記ポリペプチドの製造方法を提供することにある。

##### 【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記第一の課題を、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相同的なアミノ酸配列を有するポリペプチドにより解決するものである。

【0010】この発明は、上記第二の課題を、斯かるポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

【0011】この発明は、上記第三の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0012】この発明は、上記第四の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0013】この発明は、上記第五の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を栄養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決するものである。

##### 【0014】

【発明の実施の形態】この発明のポリペプチドは、前述のごとく、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違するアミノ酸配列を有しており、免疫担当細胞に単独又は適宜補因子とともに作用させると、IFN $\gamma$ の産生を誘導する。

【0015】この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、この組換えDNAを、通常、当該ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を発現する。

【0016】この発明の複製可能な組換えDNAは、通常、当該ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を発現する。

【0017】この発明の形質転換体は、培養すると、当該ポリペプチドを産生する。

【0018】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量のポリペプチドが容易に得られる。

10

20

30

40

50

【0019】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。本発明者が、哺乳類由来の細胞が産生するサイトカイン類につき研究していたところ、マウスの肝臓中に、IFN- $\gamma$ の産生を誘導する従来未知の全く新規な蛋白質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの蛋白質を単離し、その部分アミノ酸配列を決定するとともに、マウス肝細胞から単離したmRNAを鋳型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーの存在下でRT-PCR反応させて蛋白質を部分コードするDNA断片を採取し、これをプローブにして上記mRNAから別途作製したcDNAライブラリーを鋭意検索したところ、471塩基対からなる、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、マウス肝臓から単離した蛋白質は157個のアミノ酸からなり、配列番号3に併記したアミノ酸配列を有することが半明した。なお、その配列番号3において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸はメチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0020】これらの知見に基づき、本発明者がヒト肝細胞由来のmRNAを引続き検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する、さらに別のポリペプチドをコードする遺伝子が存在することを見出した。この遺伝子は配列表における配列番号2に示す塩基配列を含んでなり、解読したところ、157個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドをコードしていることが半明した。なお、その配列番号1において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

【0021】配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の操作を要約すると、次のようになる。

(1) クロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてマウス肝細胞から免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する蛋白質を単離し、高度に精製した。

(2) 精製蛋白質をトリプシン消化し、消化物から2種類のペプチド断片を単離し、アミノ酸配列を決定した。

(3) マウス肝細胞からmRNAを採取し、これを鋳型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの存在下でRT-PCR反応させてDNA断片を調製する一方、それら部分アミノ酸配列に基づき別途化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにしてそれらDNA断片を検索し、蛋白質を部分コードするDNA断片を得た。

(4) このDNA断片を同位体標識した後、前記mRNAを鋳型に調製したcDNAライブラリーにハイブリ

ダイズさせ、顕著な会合を示した形質転換体を選択した。

(5) 形質転換体からcDNAを採取し、塩基配列を決定し、解読するとともに、解読したアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較することにより、蛋白質が配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有し、マウスにおいて、このアミノ酸配列が配列番号3に併記した塩基配列によりコードされていることを確認した。

(6) さらに、ヒト肝細胞由来のmRNAを鋳型にcDNAライブラリーを作製する一方、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を調製し、同位体標識した後、上記cDNAライブラリーにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した形質転換体を選択した。

(7) 形質転換体からcDNAを採取し、塩基配列を決定し、解読したところ、この発明のポリペプチドは配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列は配列表における配列番号2に示す塩基配列によりコードされていることを確認した。

【0022】免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導するこの発明のポリペプチドは、本発明者の長年に亘る研究の成果として見出されたものであり、配列表における配列番号1に見られるごとく、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違するアミノ酸配列を有している。天然由来のポリペプチドであろうと、組換えDNA技術により創製されたポリペプチドであろうと、それが配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相等的なアミノ酸配列を有するかぎり、すべてこの発明に包含されるものとする。配列番号1のアミノ酸配列に相等的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の生物作用を実質的に変えることなく、配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成や培養温度・pHなどに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の生物作用は保持しているものの、配列番号1のアミノ酸配列におけるN末端及び/又はC末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の産生することがある。斯かる変異体も、それが免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導するかぎり、当然、この発明のポリペプチドに包含される。

【0023】この発明のポリペプチドは、それをコードするDNAを含む形質転換体を栄養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取することにより製造することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相等的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ること

ができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてもよい。また、DNAが宿主中で実際に当該ポリペプチドの産生を発現するために、当該ポリペプチド又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは云うまでもない。

【0024】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、ヒトの肝臓が挙げられ、その細胞からは、例えば、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、例えば、市販のポリ(A)付加ヒト肝臓mRNAを蔗糖濃度勾配などにより分画してmRNAを単離する。このmRNAを鋳型に逆転写酵素とポリメラーゼを作用させて二重鎖cDNAとし、これを自律複製可能な適宜ベクターに挿入し、得られた組換えDNAを大腸菌などの適宜宿主に導入して形質転換体とする。この形質転換体を栄養培地で培養し、培養物にコロニーハイブリダイゼーション法を適用してこの発明のポリペプチドをコードするDNAを含む形質転換体を採取する。斯くして得られた形質転換体を通常一般の方法により処理すれば、この発明のDNAが得られる。一方、この発明のDNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号2に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を分離し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0025】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、例えば、pKK223-2、pGEX-2T、pRL-λ、pBTrp2 DNA、pUB110、YEp13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121などのプラスミドベクターが挙げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核生物で発現させるにはpKK223-2、pGEX-2T、pRL-λ、pBTrp2 DNA、pUB110、YEp13が、また、動植物由来の細胞で発現させるにはTiプラスミド、Riプラスミド、pBI121が好適である。

【0026】斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、この発明のDNAを含む遺伝子と自

律複製可能なベクターとを制限酵素及び/又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、II型の制限酵素、詳細には、Sau 3A I、Eco R I、Hind III、Bam H I、Sal I、Xba I、Sac I、Pst Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られた組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0027】この発明による組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体をクロニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、栄養培地で培養し、免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導するポリペプチドを産生するものを選択すればよい。

【0028】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体又は細胞内外に当該ポリペプチドを産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステイープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度25乃至65℃、pH5乃至8に保ちつつ、通気攪拌などによる好気的条件下で約1乃至10日間培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物はIFN-γ誘導剤としてそのまま使用可能なこともあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより当該ポリペプチドを菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精製には菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの生理活性物質を精製するための斯界における通常一般の方法が採用でき、必要に応じて、これら方法を適宜組合せればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製したポリ

ペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。

【0029】前述のとおり、この発明のポリペプチドは、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する性質を有する。この性質により、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- $\gamma$ を製造の際の誘導剤として、さらには、IFN- $\gamma$ に感受性を有する、例えば、エイズや尖圭コンジロムなどのウイルス性疾患、腎臓癌、肉芽腫、菌状肉肉症、脳腫瘍などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患に対する治療剤・予防剤として有用である。

【0030】この発明のポリペプチドは、通常、免疫担当細胞を培養してIFN- $\gamma$ を製造するための培養培地に共存させるか、IFN- $\gamma$ 感受性疾患の治療・予防のために哺乳類の体内に直接投与される。すなわち、前者の用途においては、哺乳類の末梢血から分離される白血球や、例えば、HBL-38細胞、Mo細胞、Jurkat細胞、HuT78細胞、EL4細胞、L12-R4細胞などの培養株化された免疫担当細胞をこの発明のポリペプチドを1ml当たり約0.1ng乃至1 $\mu$ g、望ましくは、約1乃至100ng含む適宜の培養培地に浮遊させる。必要に応じて、培養培地にマイトジェンやインターロイキン2、抗CD3抗体などのT細胞刺激物質を加え、培養培地を温度約30乃至40°C、pH約5乃至8に保ちつつ、培養培地を適宜新鮮なものと取替えながら、通常一般の方法により約1乃至100時間培養する。斯くして得られる培養物を生理活性物質を精製するための慣用の方法、すなわち、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種又は2種以上を適宜組合せて適用することにより、IFN- $\gamma$ を採取することができる。

【0031】一方、IFN- $\gamma$ 感受性疾患の治療・予防のためには、哺乳類の体内にこの発明によるポリペプチドを直接投与すればよい。具体的には、この発明のポリペプチドを投与に適した適宜剤型に調製後、哺乳類に経口又は経粘膜投与するか、例えば、皮内、皮下、筋肉内、静脈内又は腹腔内に注射投与する。この発明のポリペプチドを投与し得る哺乳類はヒトに限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、サルなどの哺乳動物であってもよい。この発明のポリペプチドは強力なIFN- $\gamma$ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- $\gamma$ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のIFN- $\gamma$ 産生を迅速に誘導できる利点がある。なお、念のため

に申し述べると、この発明のポリペプチドは医薬品としての安全性の要件を充たしている。

【0032】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、そこで用いられる手法は斯界において慣用のものであり、例えば、ティー・マニャティス等『モレキュラー・クロウニング・ア・ラボラトリー・マニュアル』、1989年、コールド・スプリング・ハーバー発行や、村松正実『ラボマニュアル遺伝子工学』、1988年、丸善出版発行などにも詳述されている。

#### 【0033】

【実施例1 精製蛋白質の調製】8週齢の雌CD-1マウス600匹の腹腔内にコリネバクテリウム・パルバム(ATCC11827)を60°Cで1時間加熱して調製した死菌体を1mg/匹注射投与し、通常一般の方法で7日間飼育後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1 $\mu$ g/匹注射投与した。1乃至2時間後、マウスを屠殺し、採血後、肝臓を摘出し、8倍容の50mM磷酸緩衝液(pH7.3)中、ホモゲナイザーにより破碎して抽出した。抽出物を約8,000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清約91に硫酸アンモニウムで飽和させた50mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが45%飽和になるように加え、4°Cで18時間静置後、約8,000rpmで30分間遠心分離して上清約191を採取した。

【0034】この上清を予め1M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液(pH7.3)で平衡化させておいたファルマシア製『フェニルセファロース』約4.61のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1Mから0.2Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、50mM磷酸緩衝液(pH7.3)をSV0.57で通液した。硫酸アンモニウム濃度が0.8M付近のときに溶出した画分約4.81を採取し、膜濃縮し、20mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4°Cで18時間透析後、予め20mM磷酸緩衝液(pH6.5)で平衡化させておいたファルマシア製『DEAE-セファロース』約250mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに20mM磷酸緩衝液(pH6.5)をSV1.2で通液し、塩化ナトリウム濃度0.13M付近で溶出した画分約260mlを採取した。

【0035】この画分を濃縮し、25mMビスートリス緩衝液(pH7.1)に対して4°Cで18時間透析後、予め新鮮な同一緩衝液で平衡化させておいたファルマシア製『Mono-P』約24mlのカラムに負荷し、pH7からpH4に下降するpH勾配下、カラムに10%(v/v)ポリバッファー74(pH4.0)を通液した。pHが約4.8のときに溶出した画分約23mlを採取し、濃縮し、予め7mM磷酸水素二ナトリウム、3mM磷酸二水素ナトリウム及び139mM塩化ナトリウ

ムからなる混液 (pH 7.2) で平衡化させておいたファルマシア製『スーパーデックス75』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液を通過してゲル濾過クロマトグラフィーしたところ、分子量19,000ダルトン付近に目的とする蛋白質が溶出した。蛋白質を含む画分を採取し、濃縮して下記の実施例2に供した。収量は、マウス1匹当たり約0.6  $\mu$ gであった。

#### 【0036】

【実施例2 部分アミノ酸配列】実施例1で調製した精製蛋白質を含む水溶液の一部をとり、約50  $\mu$ lまで濃縮した。濃縮物に3% (w/v) SDS、60% (v/v) グリセロール及びジチオトレイトール60mg/mlからなる混液25  $\mu$ lを加え、50°Cで30分間インキュベート後、15% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上に移し、常法にしたがって電気泳動した。その後、ゲルを0.1% (w/v) クーマシーブリリアントブルーR250を含む50% (v/v) 水性メタノールと10% (v/v) 酢酸水溶液の混液に浸漬して染色し、12% (v/v) 水性メタノールと7% (v/v) 酢酸水溶液の混液で繰返し濯いで脱色し、蒸留水中に18時間浸漬して洗浄後、ゲルよりクーマシーブリリアントブルー染色されたIFN- $\gamma$ 誘導活性ある部分を切出し、凍結乾燥した。

【0037】次に、乾燥ゲルをシグマ製『TPCKトリプシン』2  $\mu$ g/mlを含む100mM炭酸水素ナトリウム、0.5mM塩化カルシウム及び0.02% (v/v) Tween 20水溶液からなる混液0.6mlに浸漬し、37°Cで18時間インキュベートして蛋白質をトリプシン消化した。そして、消化物を遠心分離して上清を採取する一方、沈殿部を0.001% (v/v) Tween 20を含む1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸1mlに浸漬し、室温下で4時間振盪後、遠心分離して上清を採取した。新たに生じた沈殿を0.001% (v/v) Tween 20を含む70% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸、0.001% (v/v) Tween 20を含む50% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸及び50% (v/v) 水性アセトニトリルの順序で上記と同様に処理し、得られた上清と上記で得られた上清をプールし、250  $\mu$ lまで濃縮後、遠心濾過した。

【0038】斯くして得られたペプチド断片を含む水溶液を、予め0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた東ソー製高速液体クロマトグラフィー用カラム『HPLC ODS-120T』に負荷し、カラムを0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で洗浄後、溶出液中のペプチド濃度を吸光度計により214nm及び280nmの波長下でモニタしながら、0% (v/v) から70% (v/v) に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を0.5ml/分の流速で通過した。そして、通液開始から約75分後又は約55分後に溶出し

た画分 (以下、それぞれ『ペプチド断片A』又は『ペプチド断片B』と云う。) を別々に採取した。このときの溶出パターンを図1に示す。

【0039】その後、パーキン・エルマー製蛋白質・シーケンサ『473A型』を使用し、常法にしたがってこれらペプチド断片A及びBのアミノ酸配列を調べたところ、それぞれ、配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有していた。

#### 【0040】

【実施例3 蛋白質をコードするDNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列】

#### 【0041】

【実施例3-1 全RNAの調製】実施例1と同様にし、調製したマウス肝細胞を湿重で3gとり、これを6Mグアニジンイソチオシアナート、10mMクエン酸ナトリウム及び0.5% (w/v) SDSからなる混液 (pH 7.0) 20mlに浸漬し、ホモゲナイザーで破碎した。常法にしたがって、35ml容遠心管に5.7M塩化セシウムを含む0.1M EDTA (pH 7.5) を25ml注入し、その上部に細胞破碎物を10ml重層し、この状態で20°C、25,000rpmで20時間超遠心分離後、RNA画分を採取した。このRNA画分を15ml容遠心管にとり、等容量のクロロホルム/ブタノール混液 (4:1) を加え、5分間振盪し、4°C、10,000rpmで10分間遠心分離した後、水層部を採取し、2.5倍容のエタノールを加え、-20°Cで2時間静置して全RNAを沈殿させた。この沈殿を採取し、75% (v/v) 水性エタノールで洗浄後、滅菌蒸留水0.5mlに溶解して下記の実施例3-2に供した。なお、全RNAの収量は約4mgであった。

#### 【0042】

【実施例3-2 蛋白質を部分コードするDNA断片の調製】実施例3-1で調製した全RNA 1  $\mu$ gに25mM塩化マグネシウムを4  $\mu$ l、10 $\times$ PCR緩衝液 (100mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3)、500mM塩化カリウム) を2  $\mu$ l、1mM dNTPミックスを8  $\mu$ l、1単位  $\mu$ lのRNaseインヒビターを1  $\mu$ l、2.5単位  $\mu$ lの逆転写酵素を1  $\mu$ l及び2.5  $\mu$ Mランダムヘキサマーを1  $\mu$ l加え、滅菌蒸留水で20  $\mu$ lとした。混合物を0.5ml容反応管にとり、常法にしたがって25°Cで10分間、42°Cで30分間、99°Cで5分間、5°Cで5分間インキュベートして逆転写酵素反応させ、第一ストランドcDNAを含む水溶液を得た。

【0043】この第一ストランドcDNA水溶液20  $\mu$ lに25mM塩化マグネシウムを4  $\mu$ l、10 $\times$ PCR緩衝液を8  $\mu$ l、2.5単位  $\mu$ lアンプリタックDNAポリメラーゼを0.5  $\mu$ l、さらに、センスプライマー又はアンチセンスプライマーとしてプライマー1及びプライマー2をそれぞれ1pmolずつ加え、滅菌蒸留



水で100 $\mu$ lとした。そして、常法により、混合物を94 $^{\circ}$ Cで1分間、45 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで3分間の順序でインキュベートするサイクルを40回繰返して反応させ、第一ストランドcDNAを鋳型に当該蛋白質を部分コードするDNA断片を増幅した。なお、プライマー1及びプライマー2は、配列表の配列番号4及び5におけるPro-Glu-Asn-Ile-Asp-Asp-Ile又はPhe-Glu-Asp-Met-Thr-Asp-Ileで表わされるアミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドであり、それぞれ5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3'又は5'-TTYGARGAYATGACNGAYAT-3'で表わされる塩基配列を有していた。

【0044】このようにして得たPCR産物の一部をとり、常法により2% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動して分画し、ナイロン膜上に移取り、0.4N水酸化ナトリウムで固定し、2 $\times$ SSCで洗浄し、風乾後、5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、65 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。別途、プローブ1として、配列表の配列番号4におけるPhe-Glu-Glu-Met-Asp-Proで表わされるアミノ酸配列に基づき5'-TTYGARGARATGGAYCC-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブ1を1pmolとり、これと5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAを含む混液にナイロン膜を浸漬し、45 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートしてハイブリダイズさせた。ナイロン膜を6 $\times$ SSCで洗浄後、常法によりオートラジオグラフィーしたところ、目的とするDNA断片がPCR産物に含まれていた。

【0045】次に、残りのPCR産物に宝酒造製プラスミドベクター『pT7ブルーT』を50ngと適量のT4 DNAリガーゼを加え、さらに、100mM ATPを最終濃度1mMまで加えた後、16 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートしてプラスミドベクターにDNA断片を挿入し、得られた組換えDNAをコンピテントセル法によりファルマシア製大腸菌『NoVa Blue』株に導入して形質転換体とした。得られた形質転換体を10g/1バクトトリプトン、2.5g/l塩化ナトリウム、15g/lバクタアガー、100mg/lアンピシリン、40mg/l X-Gal及び23.8mg/lイソプロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(以下、「IPTG」と略記する。)を含むプレート培地に接種し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養してコロニーを形成させた。常法にしたがって、プレート培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してコロニーを移取った後、ナイロ

ン膜を剥離し、0.5N水酸化ナトリウム及び1.5M塩化ナトリウムを含む混液に7分間浸漬して溶菌した。その後、ナイロン膜を1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)に3分間浸漬し、2 $\times$ SSCで洗浄し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬して固定し、5 $\times$ SSCでさらに洗浄し、風乾後、5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5% (w/v) SDS及び100 $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、65 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。その後、常法にしたがってナイロン膜にプローブ1をハイブリダイズさせ、6 $\times$ SSCで洗浄後、前記と同様にオートラジオグラフィーし、プローブ1と顕著な会合を示した形質転換体をプレート培地から採取した。

【0046】この形質転換体をアンピシリン100 $\mu$ g/mlを含むレーブロス培地(pH7.2)に接種し、37 $^{\circ}$ Cで18時間培養後、培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により調べたところ、この組換えDNAは配列表の配列番号3に示す塩基配列における第85乃至281番目に相当する塩基配列のDNA断片を含んでいた。

#### 【0047】

【実施例3-3 mRNAの調製】実施例3-1で調製した全RNAを含む水溶液を0.05mlとり、これに1mM EDTAと0.1% (w/v) SDSを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を0.5ml加え、滅菌蒸留水で全量を1mlとした。混合物に日本ロシュ製オリゴd(T)<sub>18</sub>ラテックス『オリゴテックス-dT30スーパー』を1ml加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して変性させた後、直ちに氷浴中で3分間冷却した。5M塩化ナトリウムを0.2mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、25 $^{\circ}$ C、10,000rpmで10分間遠心分離し、上清を除いて得られたペレット状の沈殿に滅菌蒸留水0.5mlを加えて懸濁させ、65 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートしてオリゴテックスからmRNAを溶出させた。回収したmRNAは約5 $\mu$ gであった。

#### 【0048】

【実施例3-4 cDNAライブラリーの作製】アマシャム製cDNAクローニングキット『cDNA合成システム・プラス』を使用し、実施例3-3で調製したmRNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1.5ml容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液4 $\mu$ l、ピロリン酸ナトリウム溶液1 $\mu$ l、ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液1 $\mu$ l、デオキシヌクレオチド三リン酸混合液2 $\mu$ l及びオリゴd(T)<sub>18</sub>プライマー溶液1 $\mu$ lをこの順序で加え、さらに、実施例3-3で調製したmRNAを2 $\mu$ g加えた後、滅菌蒸留水で19 $\mu$ lとした。混合物に逆転写酵素20単位を含

む溶液1 $\mu$ lを加え、42°Cで40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0049】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を37.5 $\mu$ l、大腸菌由来のリボヌクレアーゼHを0.8単位、DNAポリメラーゼIを23単位この順序で加え、滅菌蒸留水で100 $\mu$ lとした後、12°Cで60分間、22°Cで60分間インキュベートし、T4 DNAポリメラーゼを2単位加え、37°Cでさらに10分間インキュベートして第二ストランドcDNAを含む反応物を得た。反応物に0.25M EDTA (pH8.0)を4 $\mu$ l加えて反応を停止させた後、常法によりフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してcDNAを採取した。

【0050】このようにして得たcDNAにL/K緩衝液を2 $\mu$ l、Eco RIアダプターを250pmol、T4 DNAリガーゼを2.5単位この順序で加え、滅菌蒸留水で20 $\mu$ lとした後、15°Cで16時間インキュベートしてcDNA両端にEco RIアダプターを連結した。反応物に0.25M EDTAを2 $\mu$ l加えて酵素を失活させ、常法により分子篩クロマトグラフィーにより未反応のEco RIアダプターを除去し、L/K緩衝液を40 $\mu$ lとT4ポリヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で全量400 $\mu$ lとし、37°Cで30分間インキュベートしてEco RI切断部位をメチル化した後、反応物をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してDNAを採取した。DNAに適量の $\lambda$ gt10アームを含むL/K緩衝液を1.5 $\mu$ lとT4 DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で全量15 $\mu$ lとし、15°Cで16時間インキュベートしてライゲートした後、通常の生体外パッケージングを適用して組換え $\lambda$  DNAを含むファージを得た。

#### 【0051】

【実施例3-5 組換えDNAのクローニング】アマシヤム製大腸菌NM514株に実施例3-4で調製したファージを常法により感染させた後、10g/1バクトトリプトン、5g/1バクトイーストエキストラクト、10g/1塩化ナトリウム及び15g/1バクタアガーを含む寒天培地(pH7.0)に接種し、37°Cで16時間培養してプラークを形成させた。寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してプラークを移取り、剥離した後、先ず、0.5M水酸化ナトリウムと1.5M塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)に3分間浸漬する操作を繰返した。ナイロン膜を2 $\times$ SSCで濯ぎ、風乾し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬し、5 $\times$ SSCでさらに濯ぎ、風乾後、5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを100 $\mu$ g/ml含む混液に浸漬し、65°Cで3時間インキュベートし

た。別途、実施例3-2で調製したDNA断片をアマシヤム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』により<sup>32</sup>P標識してプローブ2とし、その適量と5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト溶液、0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを100 $\mu$ g/ml含む混液にナイロン膜を浸漬し、65°Cで20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、6 $\times$ SSC中で20分間、2 $\times$ SSC中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーし、プローブ2に顕著な会合を示したファージDNAクローンを採取した。

【0052】常法にしたがってこのクローンを大腸菌中で増幅し、菌体から組換えDNAを抽出した。組換えDNAを制限酵素Eco RIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19 (ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とプラスミド断片を常法によりDNAリガーゼで連結して組換えDNAとした。そして、この組換えDNAを通常のコンピテントセル法により大腸菌JM109株(ATCC53323)に導入し、形質転換体を得た。

#### 【0053】

【実施例3-6 DNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列の決定】実施例3-5で調製した形質転換体をレーブロス培地(pH7.2)に接種し、37°Cで18時間振盪培養した。培養物から形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により処理してこの発明のDNAを含む組換えDNAを得た。蛍光光度計を使用する自動シーケンサにより分析したところ、この組換えDNAは配列表における配列番号3に示す塩基配列を含んでなり、解読したところ、同じく配列番号3に示すアミノ酸配列をコードしていることが示唆された。このアミノ酸配列においては、その第79乃至103番目又は第26乃至43番目に配列表における配列番号4及び5に示す部分アミノ酸配列が含まれており、このことは、マウスにおいて、配列番号3に示すアミノ酸配列のポリペプチドが、同じく配列番号3に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。なお、その配列番号3において、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸はメチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0054】次の実施例4乃至7では、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片をプローブに使用し、ヒト肝臓mRNAから免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導するさらに別のポリペプチドをコードするcDNAを採取する。そして、そのcDNAの塩基配列を決定し、解読して、この発明によるポリペプチドのアミノ酸配列を決定するとともに、cDNAを大腸菌で発現させ、産生したポリペプチドの性質・性状を調べる。

#### 【0055】

【実施例4 ポリペプチドをコードするDNAの塩基配

列とポリペプチドのアミノ酸配列】

#### 【0056】

【実施例4-1 cDNAライブラリーの作製】アマシヤム製cDNAクローニングキット『cDNA合成システム・プラス』を使用し、クローンテック製ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1.5ml容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液を10 $\mu$ l、1mMピロリン酸ナトリウム溶液を2.5 $\mu$ l、1 $\mu$ g/ $\mu$ lヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒター溶液を2.5 $\mu$ l、1 $\mu$ g/ $\mu$ lデオキシヌクレオチド三リン酸溶液を5 $\mu$ l及び1 $\mu$ g/ $\mu$ lオリゴdTプライマー溶液を2.5 $\mu$ lとり、ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAを5 $\mu$ g加え、滅菌蒸留水で45 $\mu$ lとした後、逆転写酵素を100単位含む溶液を5 $\mu$ l加え、42°Cで40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0057】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を93.5 $\mu$ l、大腸菌由来のリボヌクレアーゼHを4単位、DNAポリメラーゼを115単位加え、滅菌蒸留水で250 $\mu$ lとし、12°Cで60分間、22°Cで60分間、70°Cで10分間この順序でインキュベートした後、T4ポリメラーゼを10単位加え、37°Cでさらに10分間インキュベートした。0.25M EDTA (pH8.0)を10 $\mu$ l加えて反応を停止させた後、反応物を常法にしたがってフェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈澱して第二ストランドcDNAを得た。

【0058】このようにして得た第二ストランドcDNAにL/K緩衝液(pH8.0)を2 $\mu$ l、EcoRIアダプタを250pmol、T4DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で20 $\mu$ lとし、15°Cで16時間インキュベートしてcDNAの両端にEcoRIアダプタを連結した後、0.25M EDTA (pH8.0)を2 $\mu$ l加えて反応を停止させた。分子篩クロマトグラフィーにより反応物から未反応のEcoRIアダプタを除去し、L/K緩衝液(pH8.0)を40 $\mu$ lとT4ポリヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で400 $\mu$ lとし、37°Cで30分間インキュベートしてEcoRI切断部位をメチル化した後、フェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈澱してcDNAを採取した。その後、cDNAに適量の $\lambda$ gt10アームを含むL/K緩衝液(pH8.0)を1.5 $\mu$ lとT4DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で15 $\mu$ lとし、15°Cで16時間インキュベートした後、通常の生体外パッケージングを適用して組換え入DNAを含むファージを得た。

#### 【0059】

【実施例4-2 組換えDNAのクローニング】常法により、大腸菌NM514株に実施例4-1で調製したファージを感染させた後、10g/1バクトトリプトン、

5g/1バクトイーストエキストラクト、10g/1塩化ナトリウム及び15g/1バクタアガーを含む寒天培地(pH7.0)に接種し、37°Cで16時間培養してプラークを形成させた。常法にしたがって、寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してプラークを移取った後、ナイロン膜を剥離し、まず、0.5N水酸化ナトリウムと1.5M塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)に3分間浸漬した。その後、ナイロン膜を2 $\times$ SSCで濯ぎ、風乾し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬し、5 $\times$ SSCで濯ぎ、再度風乾後、5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5%(w/v)SDS及び変性サケ精子DNAを含む混液に浸漬し、65°Cで3時間インキュベートした。

【0060】組換えDNAをクローニングすべく、別途、アマシヤム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』を使用し、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を同位体標識してプローブ3を調製した。すなわち、1.5ml容反応管に実施例3-5の方法により調製したDNA断片を25ngとり、滅菌蒸留水で45 $\mu$ lとし、95°Cで3分間加熱した後、反応管にとり、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP溶液を5 $\mu$ l加え、37°Cで30分間インキュベートして同位体標識した。その後、同位体標識したDNA断片を含む反応物に通常の分子篩クロマトグラフィーを適用し、未反応の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ を除去した。

【0061】次に、前記ナイロン膜をプローブ3の適量と5 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハルト液、0.5%(w/v)SDS及び変性サケ精子DNAを100 $\mu$ g/ml含む混液に浸漬し、60°Cで20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、6 $\times$ SSC中で20分間、2 $\times$ SSC中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーして、プローブ3に顕著な会合を示したファージDNAクローンを採取した。常法によりこのDNAクローンを大腸菌で増幅後、菌体からDNAを抽出し、制限酵素EcoRIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19(ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とベクター断片を常法によりDNAリガーゼで連結して組換えDNAとした。コンピテントセル法により、この組換えDNAを大腸菌JM109株(ATCC5323)に導入してこの発明のDNAを含む形質転換体を得た。

#### 【0062】

【実施例4-3 塩基配列とアミノ酸配列の決定】実施例4-2で調製した形質転換体をアンピシリン50 $\mu$ g/mlを含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、常法により37°Cで18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを抽出し、その塩基配列を蛍光光

度計を使用する自動シーケンサにより調べたところ、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含んでいた。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号6に併記したとおりであり、このことは、この発明のポリペプチドが配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列が配列表における配列番号2に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示唆している。なお、その配列番号6においても、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

#### 【0063】

【実施例5 複製可能な組換えDNAと形質転換体の調製】0.5ml容反応管に25mM塩化マグネシウムを8 $\mu$ l、10 $\times$ PCR緩衝液を10 $\mu$ l、1mM dNTPミックスを8 $\mu$ l、2.5単位/ $\mu$ lアンブリタックDNAポリメラーゼを0.5 $\mu$ l、実施例4-2で調製した組換えDNAを1ngとり、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端及びC末端付近の配列に基づき化学合成した5'-CGAGGGATCCTACTTTGGCAAGCTTG-3'及び5'-CAGGAATTCTAGTCTTCGTTTTG-3'で表わされる塩基配列の2種類のオリゴヌクレオチドを、それぞれ、センスプライマー又はアンチセンスプライマーとして適量加え、滅菌蒸留水で100 $\mu$ lとした。常法により、混合物を94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cとして2分間、72 $^{\circ}$ Cで3分間この順序でインキュベートするサイクルを40回繰返し、得られたPCR産物を制限酵素Bam HI及びEco RIで切断してBam HI-Eco RI DNA断片を得た。このDNA断片を適量の滅菌蒸留水に0.1 $\mu$ gとり、これに、予め制限酵素Bam HI及びEco RIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pGEX-2T』を10ng、10 $\times$ ライゲーション緩衝液を10 $\mu$ l及び適量のT4 DNAリガーゼを加え、さらに10mM ATPを最終濃度1mMまで加えた後、16 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートして、この発明による複製可能な組換えDNA pHIGIFを得た。

【0064】組換えDNA pHIGIFをコンピテンセル法により東洋紡績製大腸菌DH5 $\alpha$ 株に導入し、得られた形質転換体『HIGIF』をアンピシリン50 $\mu$ g/mlを含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37 $^{\circ}$ Cで18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNA pHIGIFを抽出した。ジデオキシ法により調べたところ、図2に見られるとおり、このpHIGIFにおいては、配列表における配列番号2に示す塩基配列のcDNA『HIGIF cDNA』がTacプロモータ及びグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子の下流に連結されていた。

#### 【0065】

【実施例6 形質転換体によるポリペプチドの産生】実施例5で調製した形質転換体HIGIFをアンピシリン50 $\mu$ g/mlを含むT-ブロス培地(pH7.2)に接種し、振盪しながら37 $^{\circ}$ Cで18時間種培養した。次に、30l容ジャーファーメンタに新鮮なT-ブロス培地(pH7.2)を18lずつとり、上記で得た種培養物を1% (v/v)の割合で接種し、37 $^{\circ}$ Cで通気攪拌培養した。培養中、培養物の一部を光路長1cmのキューベットにとり、波長650nmにおける吸光度が約1.5に達した時点でIPTGを最終濃度0.1mMまで加え、さらに5時間培養した。その後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、139mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)に浮遊させ、常法により超音波処理後、菌体破砕物を遠心分離し、上清を採取した。

【0066】この上清を予め139mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)で平衡化させておいたファルマシア製『グルタチオン・セファロース4B』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液で洗浄後、カラム中のゲル1mlに対してトロンピンを100U加え、室温下で16時間静置して酵素開裂反応させた。カラムに新鮮な同一混液を通液して反応物を溶出させた後、予め新鮮な前記と同一混液で平衡化させておいたファルマシア製『スーパーデックス75』のカラムに通液し、分子量18,500ダルトン付近の画分を採取した。この画分を濃縮し、凍結乾燥したところ、この発明のポリペプチドを含む固状物が培養物1l当たり約80 $\mu$ gの収量で得られた。

#### 【0067】

【実施例7 ポリペプチドの理化学的性質】

#### 【0068】

【実施例7-1 分子量】実施例6で調製した精製ポリペプチドをユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、第680~685頁(1970年)に報告している方法に準じ、還元剤の非存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量18,500 $\pm$ 3,000ダルトンに相当する位置にIFN- $\gamma$ 誘導活性ある主たるバンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、大豆トリブシンインヒビター(20,100ダルトン)及び $\alpha$ -ラクトアルブミン(14,400ダルトン)であった。

#### 【0069】

【実施例7-2 等電点】精製ポリペプチドを常法にしたがってクロマトフォーカシングしたところ、4.9 $\pm$ 1.0に等電点を示した。

## 【0070】

【実施例7-3 N末端アミノ酸配列】常法にしたがって、パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473A型』を使用して分析したところ、精製ポリペプチドは、グルタチオンS-トランスフェラーゼの付加及びトロンビンによる開裂により、配列表における配列番号7に示すN末端アミノ酸配列のチロシン残基にGly-Ser-で表わされるペプチドが付加した構造を有していた。

## 【0071】

## 【実施例7-4 生物作用】

## 【0072】

【実施例7-4 (a) マウス脾細胞におけるIFN- $\gamma$ 産生の誘導】8週齢の雌C3H/HeJマウスから脾臓を摘出し、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.4)中で分散し、新鮮な同一培地で洗浄後、ゲイ緩衝液(pH8.0)中に浸漬して溶血させた。得られた脾細胞を10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)に細胞密度 $1 \times 10^6$ 個/mlになるように浮遊させ、口径9cmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ中、37°Cで1時間培養した。シャーレ中の培養

物から浮遊細胞のみ採取し、10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)で洗浄し、下記のIFN- $\gamma$ 誘導試験に供した。

【0073】細胞密度 $1 \times 10^6$ 個/mlになるように10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)に浮遊させたマウス脾細胞を96ウェルマイクロプレート上に0.15mlずつとり、精製ポリペプチドを新鮮な同一培地で適宜希釈して0.05ml加えた後、2.5 $\mu$ g/mlコンカナバリンA又は50u/mlインターロイキン2を0.05ml添加するか添加することなく5%CO<sub>2</sub>インキュベータ中、37°Cで24時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生したIFN- $\gamma$ を通常の酵素免疫法により測定した。同時に、精製ポリペプチド、コンカナバリンA及びインターロイキン2のすべて省略した以外は同一の系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- $\gamma$ の標準品には、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準マウスIFN- $\gamma$ (Gg02-901-533)を使用し、国際単位(IU)に換算して表示した。結果を表1に示す。

## 【0074】

## 【表1】

試料濃度 ( $\mu$ g/ml)	マウス脾細胞におけるIFN- $\gamma$ 産生(IU/ml)		
	試料のみ	試料+ コンカナバリンA	試料+ インターロイキン2
10.00	12	138	118
3.33	6	88	55
1.11	5	58	18
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	11	7
0	0	4	1

## 【0075】

【実施例7-4 (b) ヒトリンパ球におけるIFN- $\gamma$ 産生の誘導】ヘパリン加注射器を使用して健常者から血液を採取し、血清無含有のRPMI1640培地(pH7.4)で2倍希釈後、フィコール上に重層し、2,000rpmで20分間遠心してリンパ球を採取した。リンパ球を10%(v/v)牛胎児血清を補足したRPMI1640培地(pH7.4)で洗浄後、リンパ球を

細胞密度 $5 \times 10^6$ 個/mlになるように浮遊させるとともに、IFN- $\gamma$ の標準品に、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準ヒトIFN- $\gamma$ (Gg23-901-530)を使用した以外は、実施例7-4(a)と同様に試験した。結果を表2に示す。

## 【0076】

## 【表2】

試料濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ヒトリンパ球におけるIFN- $\gamma$ 産生 (IU/ml)		
	試料のみ	試料 + コンカナバリンA	試料 + インターロイキン2
10.00	191	479	1,182
3.33	189	576	1,419
1.11	168	426	1,106
0.37	150	298	739
0.12	74	193	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

【0077】表1及び2の結果は、この発明のポリペプチドに、ヒト及びマウスを始めとする哺乳類の免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する性質のあることを裏付けている。すなわち、対照系において有意なIFN- $\gamma$ 産生が認められなかったところ、この発明のポリペプチドを添加した系においては、ポリペプチド濃度20に依存する有意なIFN- $\gamma$ の産生が認められた。そして、この性質は、補因子としてコンカナバリンAやインターロイキン2を共存させることにより、顕著に増強されることが判明した。

#### 【0078】

【発明の効果】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- $\gamma$ の産生を誘導する新規なポリペプチドの発見に基づくものである。この発明のポリペプチドはアミノ酸配列まで解明された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN- $\gamma$ 誘導能を発揮する。これにより、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- $\gamma$ を製造するためのIFN- $\gamma$ 誘導剤として、さらには、IFN- $\gamma$ に感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患一般に対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。

#### 配列

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp
1           5           10          15
Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
20          25          30
Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met
35          40          45          50
Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
55          60          65
Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu
70          75          80          85
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe
90          95          100
Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
105          110          115

```

【0079】この発明のポリペプチドは強力なIFN- $\gamma$ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- $\gamma$ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくても、所望のIFN- $\gamma$ 産生を迅速に誘導できる利点がある。

【0080】斯くも有用なるこの発明のポリペプチドは、これをコードするこの発明のDNAを利用することにより、所望量を容易に製造することができる。

【0081】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

#### 【0082】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：157

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

25  
Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu  
120 125 130 135  
Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val  
140 145 150  
Gln Asn Glu Asp  
155

## 【0083】配列番号: 2

配列の長さ: 471

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

## 配列

TACTTTGGCA AGCTTGAATC TAAATTATCA GTCATAAGAA ATTTGAATGA CCAAGTTCTC 60  
TTCATTGACC AAGGAAATCG GCCTCTATTT GAAGATATGA CTGATTCTGA CTGTAGAGAT 120  
AATGCACCCC GGACCATATT TATTATAAGT ATGTATAAAG ATAGCCAGCC TAGAGGTATG 180  
GCTGTAAC TA TCTCTGTGAA GTGTGAGAAA ATTTCAAYTC TCTCCTGTGA GAACAAAATT 240  
ATTTCCCTTA AGGAAATGAA TCCTCCTGAT AACATCAAGG ATACAAAAAG TGACATCATA 300  
TTCTTTCAGA GAAGTGTCCT AGGACATGAT AATAAGATGC AATTTGAATC TTCATCATAC 360  
GAAGGATACT TTCTAGCTTG TGA AAAAGAG AGAGACCTTT TAAACTCAT TTTGAAAAAA 420  
GAGGATGAAT TGGGGGATAG ATCTATAATG TTCACTGTTC AAAACGAAGA C 471

## 【0084】配列番号: 3

配列の長さ: 471

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

## 配列の特徴

20 起源

生物名: マウス

組織の種類: 肝臓

## 配列の特徴

配列を表わす記号: mat peptide

存在位置: 1..471

特徴を決定した方法: S

## 配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT 48  
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn  
1 5 10 15  
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG 96  
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met  
20 25 30  
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA 144  
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile  
35 40 45  
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT 192  
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser  
50 55 60  
GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240  
Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile  
65 70 75 80  
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT 288  
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser  
85 90 95  
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG 336  
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu  
100 105 110  
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA 384  
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu

27

28

115 120 125  
 GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT 432  
 Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp  
 130 135 140  
 AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT 471  
 Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser  
 145 150 155

## 【0085】配列番号:4

配列の長さ:25

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

10 フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys  
 20 25

## 【0086】配列番号:5

配列の長さ:18

配列の型:アミノ酸

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:中間部フラグメント

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro  
 1 5 10 15  
 Gln

## 【0087】配列番号:6

配列の長さ:1120

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列:No

アンチセンス:No

起源

生物名:ヒト

組織の種類:肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号:5'UTR

存在位置:1..177

特徴を決定した方法:S

特徴を表わす記号:leader peptide

存在位置:178..285

特徴を決定した方法:S

特徴を表わす記号:mat peptide

30 存在位置:286..756

特徴を決定した方法:S

特徴を表わす記号:3'UTR

存在位置:757..1120

特徴を決定した方法:S

配列

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATGTCTCCC AGTGCATTTT GCCCTCCTGG CTGCCAACTC 60  
 TGGCTGCTAA AGCGGCTGCC ACCTGCTGCA GTCTACACAG CTTCGGAAG AGGAAAGGAA 120  
 CCTCAGACCT TCCAGATCGC TTCCTCTCGC AACAACTAT TTGTCGAGG AATAAAG 177  
 ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG 225  
 Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met  
 1 5 10 15  
 AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC 273  
 Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn  
 20 25 30  
 CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA 321  
 Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile  
 35 40 45  
 AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT 369  
 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro  
 50 55 60



29 30  
 CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG 417  
 Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg  
 65 70 75 80  
 ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG 465  
 Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met  
 85 90 95  
 GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT 513  
 Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys  
 100 105 110  
 GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC 561  
 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile  
 115 120 125  
 AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA 609  
 Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly  
 130 135 140  
 CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT 657  
 His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA 705  
 Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys  
 165 170 175  
 GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA 753  
 Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu  
 180 185 190  
 GAC TAGCTA TTAATAATTC ATGCCGGGCG CAGTGGCTCA CGCCTGTAAT CCCAGCCCTT 812  
 Asp  
 TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG ATCACCAGAG GTCAGGTGTT CAAGACCAGC CTGACCAACA 872  
 TGGTGAAACC TCATCTCTAC TAAAAATACT AAAAATTAGC TGAGTGTAGT GACGCATGCC 932  
 CTCAATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAATCA CTGCACTCC GGAGGTAGAG 992  
 GTTGTGGTGA GCCGAGATTG CACCATTGCG CTCTAGCCTG GGCAACAACA GCAAAACTCC 1052  
 ATCTCAAAAA ATAAATAAA TAAATAAACA AATAAAAAAT TCATAATGTG AAAAAAAAAA 1112  
 AAAAAAAAAA 1120

【0088】配列番号:7

配列の長さ:10

配列の型:アミノ酸

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser  
 1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】マウス肝細胞由来の蛋白質をトリプシン消化し 40  
 て得られるペプチド断片の高速液体クロマトグラフィー  
 における溶出パターンを示す図である。

【図2】この発明による組換えDNAであるpHIGI  
 Fの構造を示す図である。

【符号の説明】

HIGIF cDNA

この発明のポリペプチド

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端フラグメント

をコードするcDNA

P t a c

G S T

スフェラーゼ遺伝子

Amp R

o r i

点

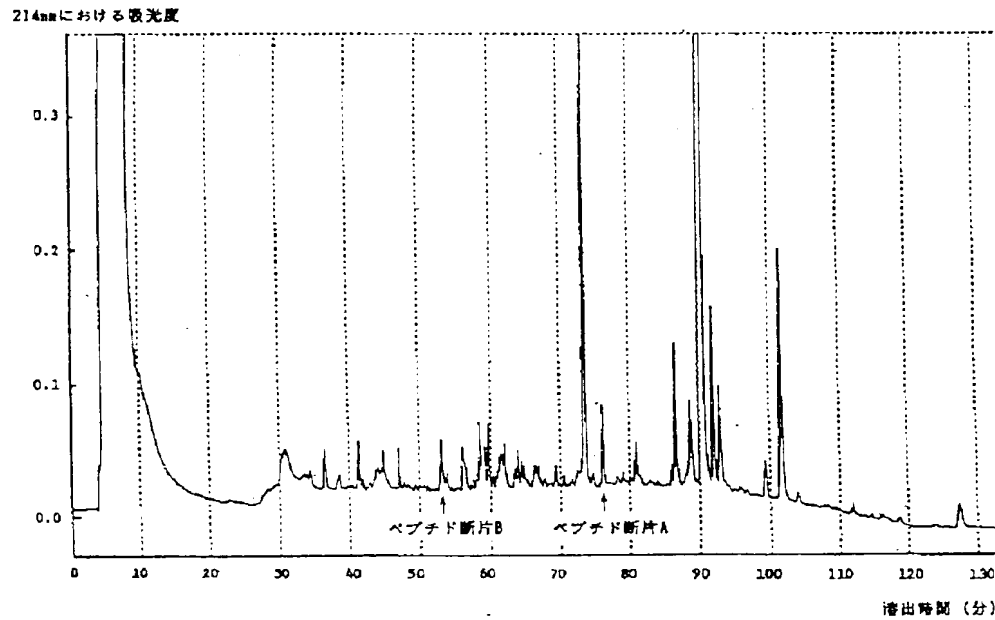
t a c プロモータ

グルタチオンS-トラン

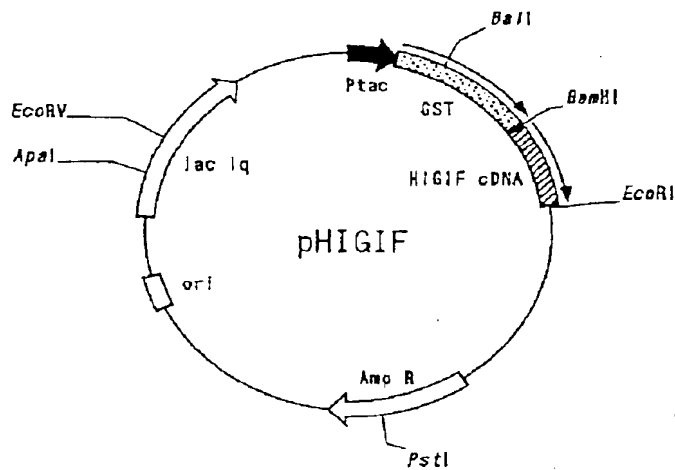
アンピシリン耐性遺伝子

大腸菌における複製開始

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>  
 // A61K 38/00  
 C07K 7/06  
 7/08  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )  
 (C12P 21/00  
 C12R 1:19 )

識別記号 庁内整理番号  
 AED

F I

技術表示箇所

( 18 )

特開平8-193098

9162-4B

C12N 15/00

ZNA A

A61K 37/02

AED